

ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ФЕРМЕНТОВ ПРОТЕОЛИЗА И АНТИПРОТЕОЛИЗА В ГЕМОЛИМФЕ И ГЕПАТОПАНКРЕАСЕ ЛЕГОЧНЫХ ПРЭСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ЭТИОНИНА И СТРЕПТОЗОТОЦИНА

Вишневецкая М.В.,

магистрант 2 года обучения ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск, Республика Беларусь

Научный руководитель – Чиркин А.А., доктор биол. наук, профессор

Ключевые слова. Протеолиз, антипротеолиз, этионин, стрептозотоцин, модельные организмы.

Keywords. Proteolysis, antiproteolysis, ethionine, streptozotocin, model organisms.

Легочные пресноводные моллюски прудовики (*Lymnaea stagnalis* L.) и роговые катушки (*Planorbarius corneus* L.) используются в различных областях биологии и медицины в качестве модельных организмов. В последние годы показан средний уровень гомологии протеолитических ферментов человека и легочных пресноводных моллюсков [1, 2].

Целью исследования явилось установление возможности использования этих модельных моллюсков для изучения фармакодинамики некоторых биологически активных субстанций на ферменты системы протеолиза-антипротеолиза.

Материал и методы. Фармакодинамическое исследование проведено на первом поколении лабораторной культуры легочных пресноводных моллюсков. В работе использованы две биологически активные субстанции: этионин – антиметаболит метионина (введение в ногу в дозе 1 мг/г массы моллюска) и стрептозотоцин – ингибитор инсулиноцитов (введение в ногу в дозе 65 мкг/г массы моллюска).

Активность ферментов системы протеолиза-антипротеолиза изучали через 3, 12, 24 и 48 часов. Определение протеолитической активности в гемолимфе и ткани гепатопанкреаса проводили с использованием в качестве субстрата стабильного в растворе низкомолекулярного хромогенного соединения БАПНА (N- α -бензоил-D,L-аргинин-паранитроанилид) и выражали в ммоль/(л \times с). Определение активности трипсиноподобных протеиназ (ТпА) и антипротеолитической активности (антипротеазный ингибитор – АПИ и α 2-макроглобулин - α 2-МГ) проводили с помощью ранее описанных методов [2]. В предварительных опытах было установлено оптимальное время инкубирования ферментативных реакций – 20 часов. В гемолимфе интактных легочных пресноводных моллюсков активность трипсиноподобных протеиназ находилась в пределах 10,3-13,5 ммоль/(л \times с), а в ткани гепатопанкреаса – 26,4-80,6 ммоль/(кг \times с). Для исследования антипротеолитической активности были выявлены оптимальные величины pH инкубационной среды, которые составили для АПИ pH 3,8, а для α 2-МГ pH 3,0. Величины активности антипротеолитической активности ферментов у легочных пресноводных моллюсков были в гемолимфе АПИ 6,0-8,2 г/л, α 2-МГ 7,3-10,2 г/л, а в гепатопанкреасе – АПИ – 5,9-6,4 г/л, α 2-МГ – 5,96-10,3 г/л [2].

Результаты и обсуждение. Этионин является антиметаболитом и антагонистом метионина. Он предотвращает включение аминокислот в белки и препятствует использованию клетками аденозинтрифосфата (АТФ). Из-за этих фармакологических эффектов этионин очень токсичен и является сильнодействующим канцерогеном [3]. После введения этионина через 3 часа активность протеолиза в гемолимфе прудовика повышалась в 1,6 раза, а в гемолимфе катушки роговой – в 3,4 раза по сравнению с контролем. Затем следовало ее снижение к 48 часам в 1,3 раза у прудовиков и в 2,1 раза у роговых катушек. В гепатопанкреасе прудовиков активность трипсиноподобных протеиназ изменялась волнообразно с двумя пиками активности через 3 часа в 12,5 раза и через 24 часа в 14,4 раза. В гепатопанкреасе роговых катушек этионин вызывал повышение активности трипсиноподобных протеиназ в интервале 3-24 часа в 3 раза по сравнению с контролем. В гемолимфе прудовиков было обнаружено снижение активности ингибиторов протеолиза в интервале 3-48 часов после введения этионина с максимальным снижением значений АПИ в 1,9 раза через 24 часа и α 2-МГ в 1,37 раза через 12 часов. В гепатопанкреасе

прудови́ков активность ингибиторов протеиназ после снижения повышалась с максимальными значениями через 48 часов после введения этионина (активность АПИ в 2,7 раза, а $\alpha 2$ -МГ – в 5 раз). Аналогичные изменения величин ингибиторов протеиназ были выявлены после введения этионина в гемолимфе и гепатопанкреасе роговых катушек. Таким образом, выявлены следующие общие тренды в динамике активности трипсиноподобных протеиназ в гемолимфе и гепатопанкреасе после введения этионина: 1) активность трипсиноподобных протеиназ преимущественно повышается в гемолимфе и гепатопанкреасе в интервале 3-24 часа с тенденцией к нормализации через 48 часов; 2) антипротеолитическая активность в гемолимфе снижается в интервале 3-24 часа с тенденцией к нормализации через 48 часов; 3) антипротеолитическая активность в гепатопанкреасе обоих видов моллюсков закономерно возрастает к 48 часам после введения этионина.

Стрептозотоцин представляет собой соединение глюкозамин – нитрозомочевина. Как и другие алкилирующие агенты из класса нитрозомочевины, он токсичен для клеток, вызывая повреждение ДНК, хотя другие механизмы также могут вносить свой вклад. Повреждение ДНК вызывает активацию PARP (поли АДФ-рибоза полимеразы), что, вероятно, более важно для индукции диабета, чем само повреждение ДНК. Стрептозотоцин подобно глюкозе транспортируется в клетку с помощью транспортного белка глюкозы GLUT2, но не распознается другими переносчиками глюкозы. Это объясняет его относительную токсичность для бета-клеток, поскольку эти клетки имеют относительно высокие уровни GLUT2 [4]. После однократного введения стрептозотоцина наблюдались две фазы гипергликемии: первая в интервале 1–4 часа, вероятно, связана с уменьшением концентрации инсулина в плазме, а вторая (финальная, устойчивая) развивалась через 24–36 часов с лабораторными признаками диабета. В гемолимфе легочных пресноводных моллюсков протеолитическая активность после введения стрептозотоцина через 24 и 48 была достоверно выше контрольного уровня. При этом у прудовиков активность ферментов протеолиза увеличивалась в 1,5 раза на вторые сутки, а у роговых катушек активность ферментов протеолиза возрастала в 6 раз через 24 часа и в 7 раз через двое суток. В гепатопанкреасе введение стрептозотоцина привело к повышению трипсиноподобной активности у прудовиков в 4,7 раза, а у роговых катушек в 1,7 раза через 24 часа. Затем последовало уменьшение величин трипсиноподобной активности через 48 часов в 5,5 и 1,7 раза, соответственно. В гемолимфе обоих видов легочных пресноводных моллюсков после введения стрептозомицина через 1 и 2 суток активность антипротеолитических ферментов снижалась, а в гепатопанкреасе повышалась.

Заключение. Таким образом, легочные пресноводные моллюски оказались удобными модельными организмами для оценки катаболических процессов, вызванных введением биологически активных субстанций, оказывающих повреждающее действие на биохимические процессы обмена глюкозы и процессы биосинтеза белков. Установлено, что на использованные в работе субстанции-антиметаболиты у легочных пресноводных моллюсков была выявлена однотипная реакция ферментов системы протеолиза-антипротеолиза – повышение активности трипсиноподобных протеаз и снижение активности антипротеазного ингибитора и $\alpha 2$ -макроглобулина. Некоторые количественные различия в степени изменения активности протеолитических и антипротеолитических ферментов между двумя видами моллюсков, возможно, связаны с различиями у них механизмов транспорта кислорода в гемолимфе – у прудовиков медьсодержащим гемоцианином, а у роговых катушек – железосодержащим гемоглобином. Эти отличия могут быть использованы при анализе протеасомного АТФ-зависимого пути деградации белков в клетках живых организмов. Легочные пресноводные моллюски по этическим соображениям, стоимости, удобству содержания, возможности доставки субстанции прямо к клеткам-мишеням из-за отсутствия сосудистых стенок превосходят модельные организмы млекопитающих. Эти организмы имеют тканевые аналоги большинства органов млекопитающих, что позволяет моделировать различные патологические процессы.

1. Чиркин, А.А. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов в изучении механизма протеолиза и его регуляции / А.А. Чиркин [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімі. навук. – 2021. – Т. 57, №. 2. – С. 206–221.

2. Чиркин, А.А. Молекулярно-структурная гомология протеолитических ферментов: монография / А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова. – Чебоксары: Издательский дом «Среда», 2022. – 124 с.
3. Shivapurkar, N. Hypomethylation of DNA in ethionine-fed rats / N.N. Shivapurkar, J. W. Mary, A. Lionel // Carcinogenesis. – 1984. – Vol. 5 (8). – P. 989–992.
4. Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas / T. Szkudelski // Physiol. Res. – 2001. – Vol. 50 (6). – P. 537–546.
5. Семёнов, И.О. Биоинформатический анализ ферментов ограниченного протеолиза человека и легочных пресноводных моллюсков / И.О. Семёнов, А.А. Чиркин // Наука – образованию, производству, экономике: материалы 72-й Регион. науч.-практ. конф. преподавателей, науч. сотрудников и аспирантов, Витебск, 20 февраля 2020 г. – Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2020. – С. 82–84. – Режим доступа: <https://rep.vsu.by/handle/123456789/20864>. – Дата доступа: 09.09.2022
6. Наука – образованию, производству, экономике: материалы XXII(69) Региональной науч.-практ. конференции преподавателей, научных сотрудников и аспирантов, Витебск, 9-10 февраля 2017 г. : в 2 т. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2017. – Т. 1 – С. 61-63. – Библиогр.: с. 63 (6 назв.). – Режим доступа: <https://rep.vsu.by/handle/123456789/10346>. – Дата доступа: 09.09.2022.

ОЦЕНКА ЖИЗНЕННОГО СОСТОЯНИЯ ДРЕВЕСНЫХ НАСАЖДЕНИЙ НА ТЕРРИТОРИИ ГУО «СТАРОСЕЛЬСКАЯ СРЕДНЯЯ ШКОЛА ВИТЕБСКОГО РАЙОНА ИМЕНИ ГЕРОЯ СОВЕТСКОГО СОЮЗА В.П. КРАЕВА»

Глушакова О.П.,

*студентка 4 курса ВГУ имени П.М. Машерова, г. Витебск, Республика Беларусь
Научный руководитель – Яновская В.В., канд. биол. наук, доцент*

Ключевые слова. Оценка жизненного состояния, учреждение образования, индекс жизненного состояния, инвентаризация, древесные насаждения.

Keywords. Life condition assessment, educational institution, life condition index, inventory, tree plantations.

Зеленые насаждения оказывают значительное влияние на формирование высококачественной среды обитания человека. Создание комплексной системы озеленения территорий учреждений образования разрешает приблизить условия окружающей среды к оптимальным показателям для жизнедеятельности населения и, в частности, для детей. Вследствие ослабления растениями техногенного загрязнения, а также в результате установления более благоприятных ландшафтных условий, это становится возможным. В то же время большая антропогенная нагрузка ведет к ослаблению состояния зеленых насаждений, что негативно сказывается на выполнении ими своих функций. Следовательно, оценка жизненного состояния зеленых насаждений должна являться неотъемлемой частью оценки состояния окружающей среды. Актуальность данного исследования заключается в проведении инвентаризации древесной растительности школьного учреждения, материалы которой могут использоваться при дальнейшем благоустройстве территории.

Цель исследования – провести инвентаризацию и оценку жизненного состояния зеленых насаждений на территории ГУО «Старосельская средняя школа Витебского района имени Героя Советского Союза В.П. Краева».

Материал и методы. Материалом для работы послужило описание древесных насаждений на основе общеевропейской методики экологического лесного мониторинга [1]. Для каждого дерева определяются следующие показатели: порода, категория состояния, процент дефолиации всей кроны, класс повреждения кроны, процент покрытия штамба (части ствола дерева от корневой шейки до первой скелетной ветви нижнего яруса кроны) эпифитными лишайниками, характер и степень повреждений энтомологического, фитопатологического происхождения, а также другой природы, состояние вершины, степень усыхания сучьев. Отнесение насаждений к категориям жизненного состояния осуществляется на основе модифицированной шкалы В.А. Алексева, в соответствии с которой древостой с индексом состояния 90–100% относятся к категории «здоровых», 80–89% – «здоровых с признаками ослабления», 70–79% – «ослабленных», 50–69% – «поврежденных», 20–49% – «сильно поврежденных», менее 20% – «разрушенных» [2]. Индекс состояния древостоя: параметр, на основе которого рассчитывается самый важный показатель, иллюстрирующий текущее состояние древесного сообщества, – категория жизненного состояния. Расчет индексов состояния древостоев производится по формуле: